

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

ANTONIJA JENDRIJEV

7267/PT

Primjena plazma aktivirane vode u germinaciji ječma
(*Hordeum vulgare* cv Golden Promise)

ZAVRŠNI RAD

Projekt: *Znanstveno-tehnološka suradnja s Mađarskom:* "Nove metode u
agronomiji temeljene na hladnim plinskim izbojnim plazmama"

Mentor: doc.dr.sc. Tomislava Vukušić

Zagreb, 2018.

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo

**Primjena plazma aktivirane vode u germinaciji ječma (*Hordeum vulgare*
cv. Golden Promise)**

Antonija Jendrijev, 00582091069

Sažetak: U ovom radu ispitan je učinak plazma aktivirane vode (PAW) na germinaciju ječma (*Hordeum Vulgare* cv Golden Promise) nakon šest dana inkubacije. Određivani su fizikalno kemijski parametri tretirane vode te je praćen učinak na stupanj klijavosti i koncentraciju ukupnih pigmenata. Uzorci vode tretirani su hladnom plazmom pri tri frekvencije: 60, 90 i 120 Hz uz upuhivanje plinova: argon, zrak, kisik i dušik. Tretmani su provedeni u trajanju deset minuta za uzorke u kojima su upuhani argon i zrak te dvadeset minuta za uzorke u koje su upuhani kisik i dušik. Ovim eksperimentom je dokazano da najpovoljniji utjecaj na stupanj klijavosti imaju tretmani PAW vodom u čijoj su proizvodnji kao radni plinovi korišteni kisik i dušik, dok je do povećanja koncentracije ukupnih pigmenata došlo u uzorcima tretiranim PAW vodom dobivenom uz upuhivanje zraka. Plazma tretmanom snizuje se pH vrijednost vode što omogućuje da takva voda ima i sterilizacijski učinak.

Ključne riječi: ječam, klijavost, klorofil, PAW, pH vrijednost

Rad sadrži: 21 stranica, 6 slika, 2 tablica, 20 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: knjižnici Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr.sc. Tomislava Vukušić, doc.

Pomoć pri izradi: Mateja Filković, univ.bacc.ing.tech.aliment.

Datum obrane: 10. rujna 2018.

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Food-Process Engineering

Application of cold plasma on germination of barley (*Hordeum Vulgare* cv Golden Promise)

Antonija Jendrijević, 00582091069

Abstract: This study examines the effect of plasma activated water (PAW) on the germination of barley (*Hordeum vulgare* cv Golden Promise) after six days of incubation. The physicochemical parameters of the treated water were determined and the effect on the degree of germination and concentration of total pigments were monitored. Water samples were treated with cold plasma at three frequencies: 60, 90 and 120 Hz with insertion of gasses: argon, air, oxygen and nitrogen. Treatments lasted for ten minutes for samples in which argon and air were injected and 20 minutes for samples in which oxygen and nitrogen were inserted. This experiment has shown that the most beneficial effect on the degree of germination is PAW water treatment in which production of oxygen and nitrogen was used as working gas while the increase of concentrations of total pigments occurred in samples treated with PAW water obtained by injection of air. Plasma treatment reduces the pH of water, which allows such water to have a sterilization effect.

Keywords: barley, chlorophyll, germination, PAW, pH value

Thesis contains: 21 pages, 6 figures, 2 tables, 20 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph. D. Tomislava Vukušić, Assistant professor

Technical support and assistance: Mateja Filković, univ.bacc.ing. tech.aliment.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJA PLAZME.....	2
2.1. Plazma	2
2.1.1. Nastajanje plazme	3
2.1.2. Primjena plazma aktivirane vode u agronomiji	4
2.2. Ječam	4
2.2.1. Morfološka i biološka svojstva ječma	4
2.2.2. Važnost i upotreba ječma	5
2.2.3. Agroekološki uvjeti za uzgoj ječma	5
3. MATERIJALI I METODE	6
3.1. Materijali	6
3.1.1. Kemikalije	6
3.1.2. Pribor i aparatura	6
3.1.3. Uzorci	7
3.2. Metode rada	7
3.2.3. Tretman visokonaponskim pražnjenjem	7
3.2.4. Metoda praćenja klijavosti ječma (Paper Towel test)	8
3.2.5. Određivanje ukupnih klorofila u klici ječma.....	9
3.2.6. Određivanje fizikalno kemijskih parametara u destiliranoj i plazma aktiviranoj vodi	9
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	11
4.1. Rezultat.....	11
4.1.1. Fizikalno kemijski parametri destilirane i plazma aktivirane vode	11
4.1.2. Praćenje klijavosti ječma (Paper Towell test).....	11
4.1.3. Određivanje koncentracije ukupnih klorofila u prokljalom ječmu	13
4.2. RASPRAVA.....	14
4.2.1. Utjecaj hladne plazme na fizikalno kemijske karakteristike destilirane vode	14
4.2.2. Utjecaj plazma aktivirane vode na klijavost ječma.....	16
4.2.3. Utjecaj plazma aktivirane vode na koncentraciju klorofila u klici prokljalog ječma	17
5. ZAKLJUČCI.....	19

6. LITERATURA	20
---------------------	----

1. UVOD

Razvojem novih tehnologija razvijaju se i mnoge metode u prehrambenoj industriji i agronomiji s ciljem proizvodnje zdravstveno sigurnije i kvalitetnije hrane. Osim toga na razvoj novih metoda utjecaj ima i masovan porast populacije koji uzrokuje povećanu potražnju za hranom. Kako bi se spriječila nova gospodarska kriza, provodi se sve više eksperimenata s ciljem poboljšanja prinosa usjeva. Velike probleme poljoprivrednicima stvaraju vremenske neprilike, kontaminacija i neplodna tla koja uzrokuju masovne gubitke. U konačnici to sve dovodi do otkrivanja novih načina kako pospješiti razvitak biljaka. Gnojidba ili navodnjavanje su jedne od metoda koje su se često primjenjivane za obogaćivanje neplodnih tla. Napretkom prirodoslovnih znanosti utvrđene su njihove negativne strane kao što su ekonomski i okolišni problemi i predložene zamjenske metode. Plazma tretman je jedna od novijih metoda za koju se smatra da ima povoljan utjecaj na rast i razvitak sjemena te je eksperimentalno dokazano da se može koristiti i kao dezinfekcijsko sredstvo (Lakshman K. Randeniya, 2015). Plazma stanje je ionizirani plin koji nastane izlaganjem plina visokim temperaturama ili magnetskom polju. To omogućuje tretiranom uzorku da zbog niske temperature iona djeluju kao hladna plazma na površinsku obradu osjetljivih materijala. Također, temperatura elektrona je dovoljna za nastajanje reaktivnih oblika kisika i dušika koji će uzrokovati da takva voda djeluje kao sredstvo za sterilizaciju (Rohit Thirumdas i sur., 2018). Osim reaktivnih oblika kisika, plazma tretmanom povećava se i koncentracija reaktivnih oblika dušika. Nitrat se smatra najsnažnijim oblikom dušika, neophodnim za klijanje biljke, osim toga bitan je sastav aminokiselina, proteina, klorofila i ostalih staničnih komponenti. Učinkovitost plazma tretmana na klijavost i rast biljaka ovisi o vrsti i stanju sjemena te ekološkim čimbenicima kao što su klima, uvjeti tla i dostupnost vode (Lakshman K. Randeniya, 2015).

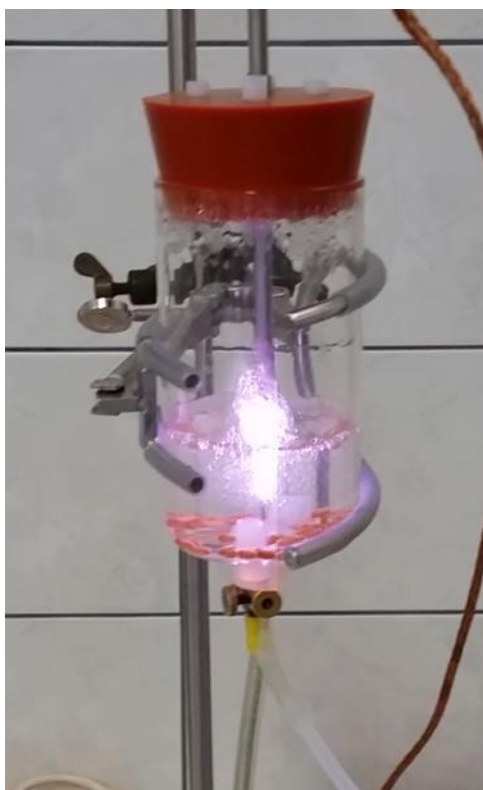
2. TEORIJA PLAZME

2.1. Plazma

Riječ *plasma* potiče iz grčkog jezika i prijevodu znači samooblikovanje materijala, a prvi ju je upotrijebio znanstvenik Irving Langmuir 1928. godine. Definirao ju je kao područje koje sadrži uravnoteženi broj nabijenih iona i elektrona. Plazma stanje smatra se četvrtim agregatnim stanjem zajedno uz tekuće, plinovito i kruto stanje. Iako je najzastupljenije stanje materije te predstavlja 99% svemira, najmanje je istraženo. Definicija plazme glasi da je ona materija, najčešće plin, kod koje je određeni udio čestica ioniziran. Zajedničko svojstvo plazme i plina je to što oboje nemaju definirani oblik ili volumen, osim ako se ne nalaze u zatvorenom spremniku. Plazma za razliku od plina pod utjecajem magnetskog polja može tvoriti strukture koje nalikuju na niti, zrake te dvostruke slojeve (Cu i Lu). Plazma nastane izlaganjem plina vrlo visokim temperaturama ili intenzivnom ionizirajućem djelovanju kao što su γ -zračenja, ultraljubičasto zračenje i mikrovalovi. Da bi se neka čestica dovela u ionizirajuće stanje i ostala u takvom stanju, potrebna je velika energija. Odnosno da bi neka tvar prešla u stanje plazme potrebno joj je osigurati energiju od nekog vanjskog izvora (Bogaerts, 2002). Klasično zagrijavanje plina nema velik utjecaj, nego izlaganjem plina temperaturama od 5000° do 6000° C uzrokovati će oscilacije unutar samog plina (Langmuir, 1928). Da bi se plin održao u stanje plazme, potrebno mu je stalno dovoditi energiju. Ovisno o načinu dotoka i količini prenesene energije mijenjaju se svojstva plazme izražene preko gustoće elektrona i temperature čestica. Kada atome izlažemo većim termalnim energijama, u sudarima se oni rastavljaju na negativno nabijene elektrone i pozitivno nabijene ione. Gibanjem čestice stvaraju električna i magnetska poja koja će imati utjecaj na te čestice. Materija u takvom stanju naziva se plazma. Pobuđeni atomi/molekule kratko žive u takvom stanju, u pravilu nekoliko nanosekundi, tijekom kojeg se atom vraća u svoje osnovno stanje uz emisiju fotona. Upravo iz te emisije fotona (svjetlosti) može se iščitati što se zapravo u plazmi događa. Takva svjetlost iz plazme je osnovni izvor informacija o čitavom Svemiru. Razlikujemo nekoliko vrsta i oblika plazme te s obzirom na pojedina svojstva svrstavamo ih prema energiji i gustoći nabijenih čestica, temperaturi i tlaku plina pri kojem nastaje plazma. Najčešća klasifikacija plazme je prema temperaturi čestica i ona razlikuje hladne i vruće plazme.

2.1.1. Nastajanje plazme

Obično se kaže da je plazma kvazineutralan plin sastavljen od ioniziranih i neutralnih čestica, koje pokazuju skupno međudjelovanje čestica zasnovano na Coulombovoj sili. Kvazineutralan plin znači da je makroskopski neutralan. (Vršnak, 1996). Kao posljedica velikog broja električkih nabijenih čestica u plazmi dolazi do elektromagnetskog međudjelovanja na znatno većim udaljenostima. Kretanjem, elektroni u sudarima predaju energiju ostalim komponentama plazma što za rezultat ima pojavu ionizacije, pobuđivanja i disocijacije ostalih čestica u plazmi. Kako je prethodno rečeno za nastanak plazme potrebno je atomima i molekulama dovesti energiju iz vanjskog izvora. Kod vrućih plazma riječ je o zagrijavanju, a kod hladnih plazma o električnom pražnjenju plinova. Električni potencijal i odgovarajuće električno polje uzrokuju privlačenje elektrona prema anodi, dok jezgru atoma privlači katoda. Porastom vrijednosti napona, dolazi do češćih naprezanja u atomima sve do dielektrične granice kada se pojavljuje iskra i plin postaje ioniziran. Tada dolazi do lavine ionizacije, sudar elektrona i neutralnog atoma stvara nove elektrone i pozitivno nabijene ione (Fridman, 2008).



Slika 1. Tretman viskonaponskim pražnjenjem

2.1.2. Primjena plazma aktivirane vode u agronomiji

Plazma tretman je sve više u svijetu prepoznatljiva metoda koja se primjenjuje u svrhu poboljšanja klijavosti različitih vrsta sjemenki te u svrhu mikrobiološke dezinfekcije. Klijanje sjemena je proces u kojem dolazi do brojnih biokemijskih promjena. Kako bi sjeme proklijalo ono zahtjeva vodu. Razvojem tehnologije dokazano je da voda koja podliježe plazma tretmanu ima pozitivan učinak na stupanj klijavosti. Plazma aktivirana voda (engl. *plasma activated water*- „PAW“) osigurava kiselu okolinu koja za posljedicu uzrokuje promjenu redoks potencijala, električnu provodnost, koncentraciju reaktivnih oblika kisika i dušika. Kao posljedica, plazma aktivirana voda ima drugačiji kemijski sastav od obične vode što joj omogućuje da se primjenjuje u različite eksperimentalne svrhe.

Za obogaćivanje tla i poboljšavanje rasta biljaka važnu ulogu imaju amonijak i nitrati koji su izvor dušika. Proveden je eksperiment u kojem sjeme jagode je tretirano običnom vodom i PAW u kojoj je dodatno upuhivan dušik. Nakon šezdeset i tri dana uzgoja mjerena je duljina stabljike te dobiveni rezultati ukazuju da ono sjeme koje je bilo tretirano s plazma tretiranom vodom proklijalo je u biljku duže stabljike. Objašnjenje tome je nastajanje nitrarnog dušika u PAW kojeg je biljka apsorbirala preko korijena i koji je jedan od osnovnih parametara odgovornih za rast biljke (Takahata i sur., 2014).

2.2. Ječam

Ječam(lat. *Hordeum vulgare*) je žitarica čiji uzgoj je poznat još u Egiptu sedam tisuća godina prije današnjice. Ima jedan od najvećih areala rasprostranjenosti među svim žitaricama. Razlog tome je velika otpornost i visok stupanj adaptacije svim vremenskim uvjetima. Svjetska proizvodnja ječma podrazumijeva oko osamdeset milijuna hektara s godišnjim prinosom 2,3 tone po hektaru. (Gagro, 1997) Razlikujemo ozime i jare forme s kraćom vegetacijom. Ozime su rasprostranjenije dok jare vrste zajedno sa raži služe kao zamjena za pšenicu u planinskim krajevima.

2.2.1. Morfološka i biološka svojstva ječma

Razlikujemo pet osnovnih dijelova ječma:

- a) Korijen ječma sastoji se od primarnog i sekundarnog korijena. Sekundarni sustav je slabo razvijen što znači da za uzgoj ječma potrebna je pravilna hranidba.

- b) Stabljiku čine pet do sedam koljenaca i međukoljenaca, nježna je i sklona polijeganju.
- c) List sastoji se od lisnog rukavca i plojke. Razlika u građi lista ječma od ostalih žitarica je u razvijenim rošćićima koji obuhvaćaju stabljiku i prelaze jedan preko drugog.
- d) Klas čine koljenasto klasno vreteno i klasić s usjecima. Klasno vreteno može imati do tri klasića čime se ječam razlikuje od ostalih žitarica čija klasna vretena mogu imati jedan klasić. Ječam se razmnožava samooplođnjom te oplodnja se pretežito odvija prije nego klas izađe iz zadnjeg rukavca lista.
- e) Plod ječma je zrno koje je građom isto kao i zrna ostalih žitarica. Plod ječma sadrži 10-15% bjelančevina, 70-75% ugljikohidrata, 4-5% celuloze, oko 2,5% ulja i 2,5-3% mineralnih tvari (Gagro, 1997).

2.2.2. Važnost i upotreba ječma

U prehrani ljudi najviše se koristi oljušteni ječam. Pahuljice i gris koji su sastavni dio prehrane ljudi dobivaju se od ječmenog zrna. Nutritivna vrijednost sto grama ječma je 354 kcal. Lako je probavljiv i hranjiv. Bitan je u prehrani domaćih životinja te se dodaje u koncentrirane krmne smjese. Veliku važnost ima i u proizvodnji piva i viskija zato što se od njega dobiva kvalitetan slad koji im daje posebna aromatična svojstva. Novi trend u prehrani su klice ječma zbog bogatog nutritivnog sastava. Sadrže sve esencijalne aminokiseline, bogate su vitaminom A i kalcijem. Smatraju se zamjenom za kavu jer povećavaju nivo energije i otklanjaju umor, osim toga sudjeluju u regulaciji šećera u krvi i visokog krvnog pritiska (Badawi, 2018).

2.2.3. Agroekološki uvjeti za uzgoj ječma

Ječam je osjetljiv na niske temperature. Minimalna temperatura potrebna za klijanje je 1-2°C, a optimalna oko 20°C. Može izdržati temperature do 40°C te smatra se otpornijom biljkom od pšenice i zobi na toplinske udare i prisilno dozrijevanje. Kao važan okolišni čimbenik smatra se svjetlost. Ječam ubraja se u biljke dugog dana te bolje uspijeva u područjima gdje dan traje duže. Kako bi mu osigurali potrebnu svjetlost, prilikom sadnje potrebno je uzimati manje razmake između redova. Kao i sve ostale žitarice, ječam je osjetljiv na sušu. Nedostatak vode negativno utječe na pravilan rast i razvoj pa u fazi rasta iziskuje veću

količinu vode nego inače. Zbog slabo razvijenog korijenovog sustava i slabe upojne snage zahtijeva plodna tla te tla koja su više neutralnija nego kisela (Gagro, 1997).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Destilirana voda
- Titan reagens
- Indikator listić (Quantofix Peroxyde 25)
- Aceton

3.1.2. Pribor i aparatura

- Petrijeve zdjelice Φ 90 mm
- Erlenmayerove tikvice od 150 mL
- Eppendorf epruvete od 1,5 mL
- mikropipeta 1-100 μ L
- nastavci za mikropipetu
- Filter papir (28×29 cm)
- Infracrveni termometar (PCEC-777, PCE Instruments, SAD)
- pH metar (HANNA instruments, Woonsocket, RI, SAD, elektroda HI11310)
- Digitalni konduktometar (HANNA instruments, Woonsocket, RI, SAD, elektroda HI763100)
- Centrifuga (Hettich, Rotofix 32)
- Vorteks (IKS, Vortex 4 basic; BV)

- ESR spektrometar
- hladna plinska plazma

Za generiranje plazme korišten je pulsni visokonaponski generator (Spellman,UK). Eksperiment je proveden sa tri različite frekvencije (60, 90 i 120 Hz), a izlazni napon bio je 20 kV mjeren sa naponskom sondom Tektronix P6015A spojenim na osciloskop Hantek DS05202BM. Kapacitet dva elektrolitska kondenzatora spojena u strujni krug sa generatorom i otpornicima iznosi 0,75 nF. Volumen reaktora je 100mL te na vrhu reaktora je gumeni čep s prilagođenim otvorom za elektrode i upuhivanje plinova. Plinovi argon, kisik i zrak upuhivani su s donje strane reaktora pomoću iglične elektrode od nehrđajućeg čelika (Microlance TM 3,81 cm). Ukupno vrijeme trajanja tretmana je deset minuta.

3.1.3. Uzorci

- 100 mL destilirane vode
- sjeme ječma (*Hordeum Vulgare* cv *Golden Promise*)

3.2. Metode rada

3.2.3. Tretman visokonaponskim pražnjenjem

Priprema uzorka podrazumijeva metodu pripreme sjemenki ječma (*Hordeum Vulgare* cv *Golden Promise*). U ovom eksperimentu ukupno je korišteno 575 sjemena ječma, od kojih je 525 tretirano s plazma aktiviranom vodom. Sjemenke ječma tretirane su PAW vodom dobivenom nakon tretmana plinskom plazmom. Korištena su dva volumena reaktora: 100 mL za vode u koje su upuhivani argon i zrak, i 500 mL za vode u koje su upuhani kisik i dušik. Tretmani plinskom plazmom provedeni su u različitom vremenskom intervalu, 10 minuta za reaktor volumena 100 mL i 20 minuta za reaktor volumena 500 mL. Neovisno o volumenu reaktora, svi uzorci vode tretirani su pri tri različite plazma frekvencije: 60 , 90 i 120 Hz. Nakon provedbe tretmana plinskom plazmom mjereni su sljedeći parametri: pH, električna vodljivost, udio kisika te koncentracija peroksida. Koncentracija peroksida je također mjerena nakon tri i pet minuta trajanja tretmana.

3.2.4. Metoda praćenja klijavosti ječma (Paper Towel test)

Klijavost ječma praćena je metodom Paper Towel testa (Seefeldt, 2012). Ona se sastojala od zamatanja sjemenki ječma u filter papir dimenzija 28*29 cm. Papir je prethodno navlažen sa četiri mililitara tretirane vode. Primijenjenom metodom osigurano je da klica i korijen rastu pravilno čime je kasnije olakšano njihovo mjerenje. Nakon toga slijedila je inkubacija pripremljenog sjemena na temperaturi od 20°C. Zbog lakšeg rukovanja uzorcima, namotani filter papiri stavljeni su u male Erlenmayerove tikvice i prekriveni plastičnim vrećicama. Nakon šesti dana inkubacije mjerene su dužine i mase korijena i klice.



Slika 2. Pripremljeni uzorci za inkubacija

3.2.5. Određivanje ukupnih klorofila u klici ječma

Određivanje ukupnih klorofila temelji se na metodi ekstrakcije u 80% acetonu (prema Benjaruk Vayupharp, Varaporn Laksanalamai, 2013). Nakon inkubacije i mjerenja duljine korijena i klice, uzeto je 0,5 g klice i 10 mL 80% acetona. Eksperiment se proveo u Eppendorf epruveti. Zbog kvalitetnije provedbe postupka uzorak se dodatno izložio 2 minute električnom mikseru i 10 minuta tresilici. Zatim je slijedilo centrifugiranje u trajanju od 5 minuta na 10° C s brojem okretaja od 2500 u svrhu bolje ekstrakcije. Koncentracija ukupnih klorofila u klici ječma određena je mjerenjem apsorbancije na 633 i 645 nm te prema navedenoj formuli dobiveni su rezultati izraženi u mg100g⁻¹.

$$\text{Ukupni klorofil (mg100g-1)} = 7,15 * A_{663} + 18,71 * A_{645}$$

3.2.6. Određivanje fizikalno kemijskih parametara u destiliranoj i plazma aktiviranoj vodi

Određivanje pH-vrijednosti i električne vodljivosti

Digitalnim pH metrom (HANNA instruments, Woonsocket, RI, SAD, elektroda HI11310) određena je pH vrijednost netretirane i plazma aktivirane vode.

Električna vodljivost određena je konduktometrom (HANNA instruments, Woonsocket, RI, SAD, elektroda HI763100).

Određivanje zasićenosti kisikom

Mjerenje zasićenosti kisikom provedeno je u destiliranoj i plazma aktiviranoj vodi pomoću digitalnog mjerača (HANNA instruments, Woonsocket, RI, SAD, elektroda HI764080). Određivanje se provodi pomoću kombinirane elektrode koja se uranja u uzorak te nakon stabilizacije vrijednost se očitava na zaslonu uređaja.

Određivanje temperature

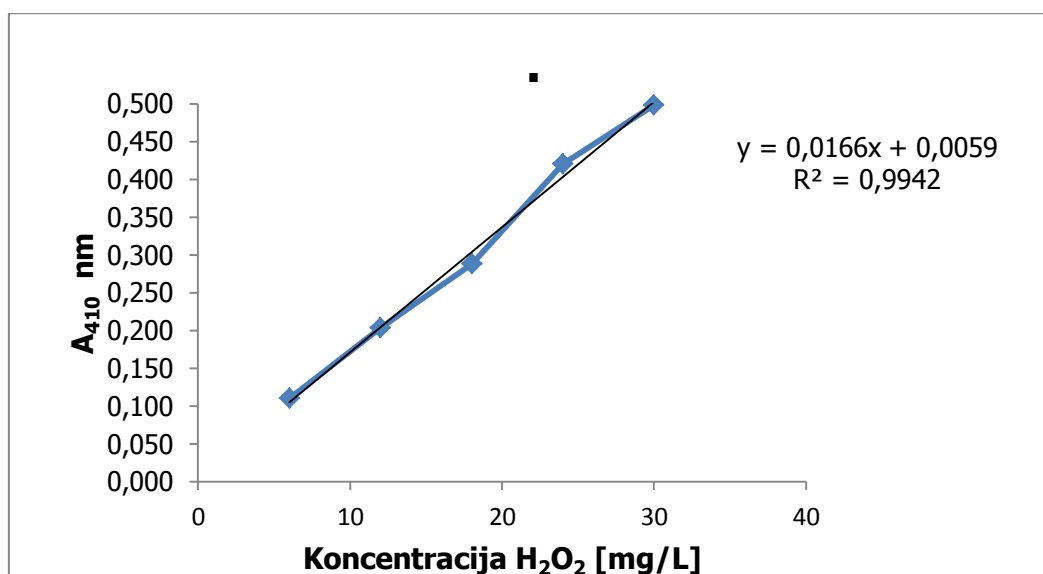
Digitalnim infracrvenim termometrom (InfraRed Tehrmometer, PCE-777, PCE Instruments, SAD) mjerena je temperatura u destiliranoj i plazma aktiviranoj vodi pozicioniranjem

termometra iznad uzorka te očitanjem temperature na zaslonu uređaja provedeno je mjerenje.

Određivanje koncentracije H_2O_2

Koncentracija vodikovog peroksida u ovom eksperimentu praćena je s dvije metode. Pomoću indikator listića (Quantofix Peroxyde 25) određena je neposredno nakon tretmana, točnije nakon tri i pet minuta, u svrhu praćenja utjecaja tretmana na koncentraciju peroksida. Drugi način je UV-Vis spektroskopijom pri valnoj duljini od 410 nm. Priprema uzorka za mjerenje sastojala se od 1 mL pripremljenog titan reagensa i 2 mL uzorka tretirane vode. U rasponu od četiri dana nakon tretmana, također spektrofotometrijski je određena koncentracija vodikovog peroksida u tretiranoj vodi koja je skladištena na sobnoj temperaturi.

Iz baždarnog dijagrama očitana je koncentracija vodikovog peroksida u mg/L .



Slika 3. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji H_2O_2

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.2. Rezultat

4.2.1. Fizikalno kemijski parametri destilirane i plazma aktivirane vode

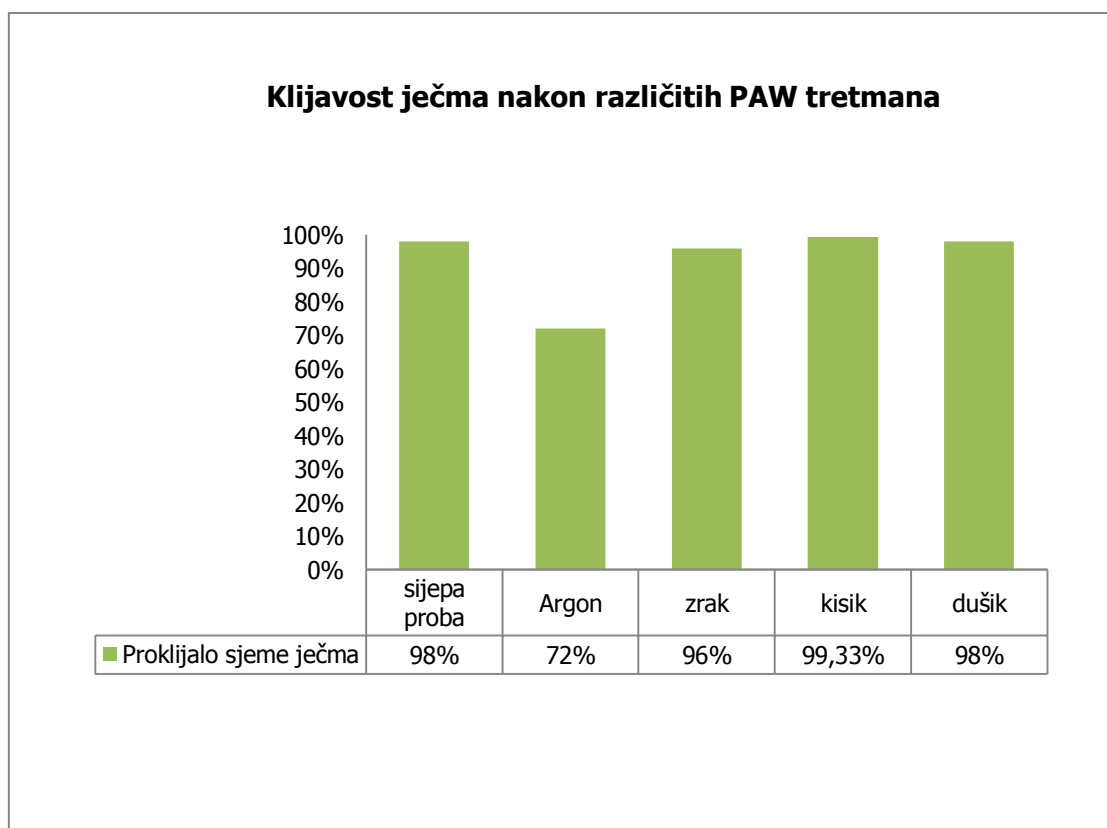
Vrijednosti pH, električne vodljivosti, zasićenosti kisikom, apsorbancije i temperature, destilirane i plazma aktivirane vode za odabrane procesne uvjete: frekvencija 60 Hz i 120 Hz uz argon, dušik, zrak i kisik prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz fizikalno kemijskih parametara vode prije i nakon tretmana plazmom pri frekvenciji 60, 90 i 120 Hz, uz argon, zrak, dušik i kisik

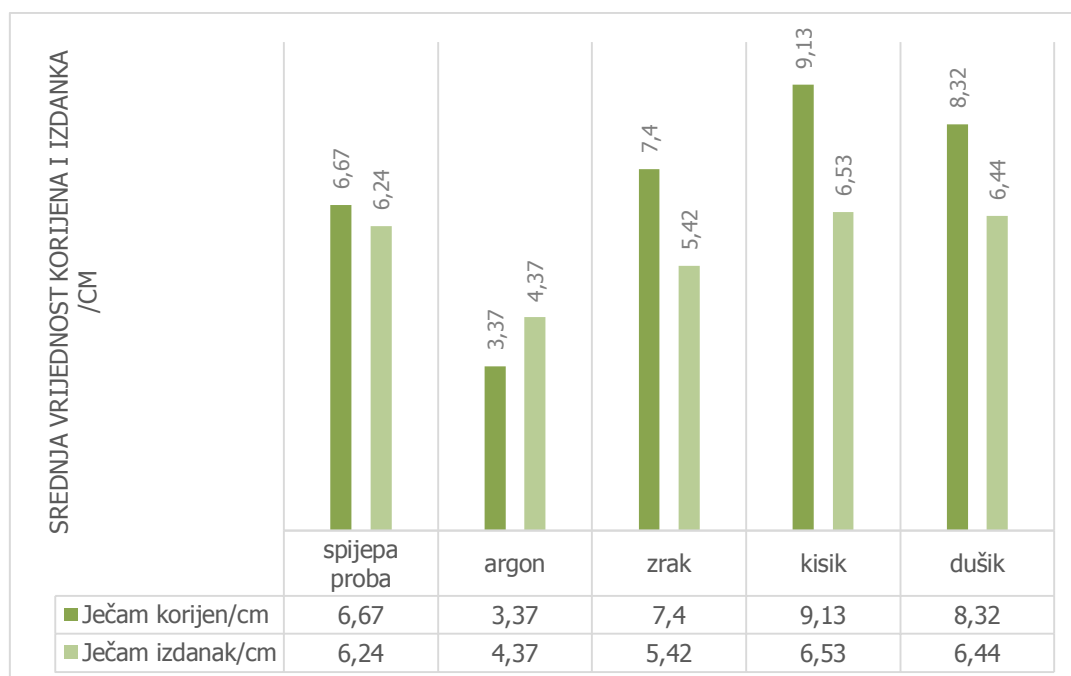
TRETMAN	VRIJEME (min)	pH	σ ($\mu\text{S/cm}$)	O ₂ (%sat)	T(°C)	c(H ₂ O ₂ ,mg/L)
-	-	6,24	2,41	77,5	19,7	-
60Hz+Ar	10	6,10	6,9	32,5	0,838	39,3
90Hz+Ar	10	5,8	6,72	34,4	0,752	39,3
120Hz+Ar	10	6	4,32	38,4	0,938	41,1
60Hz+Air	10	3,08	393	90,5	0,016	34,1
90Hz+Air	10	3,04	398	80,7	0,033	47,9
120Hz+Air	10	2,80	394	80,7	0,02	46,1
60Hz+N ₂	20	4,68	16,4	60,2	0,09	39,8
90Hz+N ₂	20	3,33	69,3	58,4	-0,008	36,9
120Hz+N ₂	20	3,47	76,9	56,4	0,001	41,4
60Hz+O ₂	20	6,59	3,52	>300	0,141	25,1
90Hz+O ₂	20	6,89	2,65	>300	0,132	25,7
120Hz+O ₂	20	6,81	2,18	>300	0,153	28

4.2.2. Praćenje klijavosti ječma (Paper Towell test)

U navedenim grafovima prikazani su rezultati dobiveni nakon šestodnevne inkubacije sjemena ječma tretiranog plazma aktiviranim vodom pri tri različite frekvencije i upuhivanjem plinova: argona, kisika, dušika i zraka.



Slika 4. Grafički prikaz % klijavosti ječma tretiranog različitim PAW tretmanima

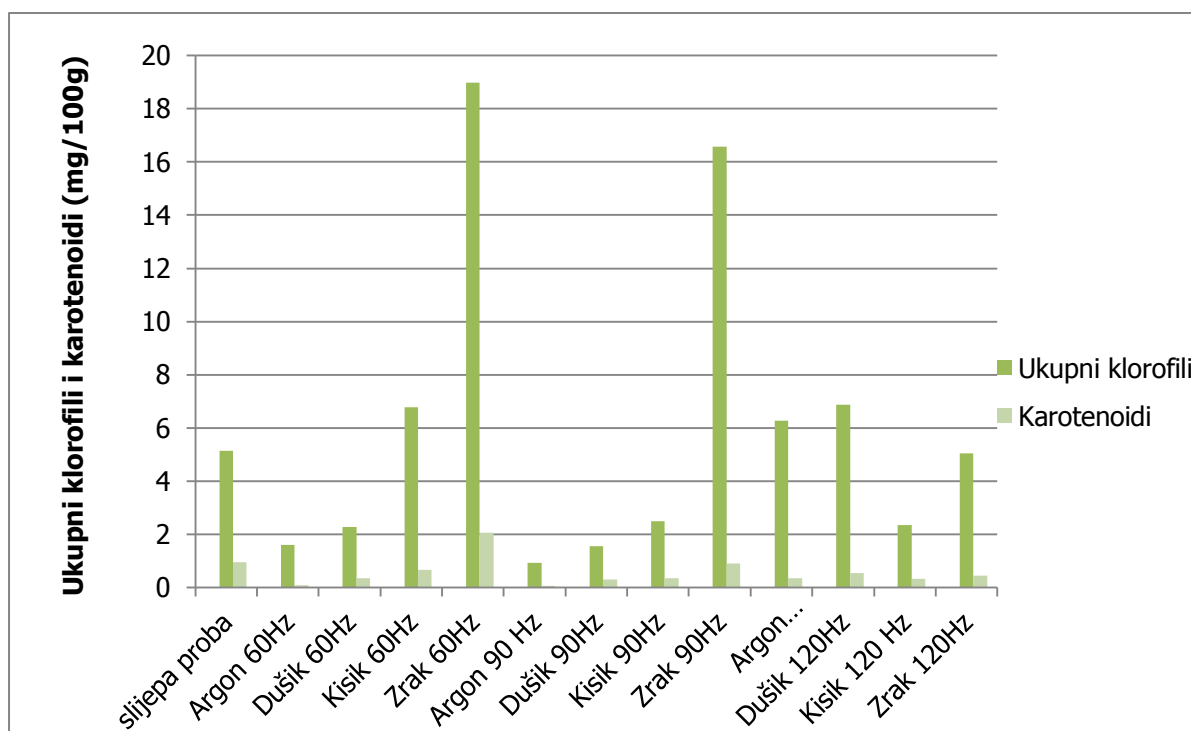


Slika 5. Srednja vrijednost korijena i klice/cm za sve plinove pri svim frekvencijama i slijepa proba

4.2.3. Određivanje koncentracije ukupnih klorofila u proklijalom ječmu

Tablica 2. Zbirna tablica svi plinovi pri svim frekvencijama i vrijednosti ukupnog klorofila i karotenoida

Uzorak:	Ukupni klorofili (mg/100g)	Karotenoidi (mg/100g)
Slijepa proba	3,45	0,95
Argon 60 Hz	1,59	0,075
Argon 90 Hz	0,92	0,058
Argon 120 Hz	6,28	0,34
Dušik 60 Hz	2,27	0,35
Dušik 90 Hz	1,56	0,29
Dušik 120 Hz	6,88	0,53
Zrak 60 Hz	18,98	2,05
Zrak 90 Hz	16,57	0,89
Zrak 120 Hz	5,05	0,43
Kisik 60 Hz	6,77	0,65
Kisik 90 Hz	2,49	0,34
Kisik 120 Hz	2,34	0,33



Slika 6. Ukupni klorofili i karotenoidi za sve plinove vs slijepa proba

4.3. RASPRAVA

4.3.1. Utjecaj hladne plazme na fizikalno kemijske karakteristike destilirane vode

Utjecaj plazma tretmana na destiliranu vodu praćen je mjerenjem pH vrijednosti, temperature, električne vodljivosti, zasićenosti kisikom i koncentracije vodikovog peroksida prije i nakon plazma tretmana. Eksperiment je proveden u reaktoru volumena 100 i 500 mililitara u vremenskom rasponu od deset minuta za reaktor od 100mL i dvadeset minuta za reaktor od 500 mL. Tretmani su provedeni pri tri različite frekvencije, 60, 90 i 120 Hz, upuhivanjem plinova: argon, zrak, kisik i dušik.

pH vrijednost

Eksperimentom je dokazano da se pH vrijednost smanjuje s porastom primijenjene frekvencije i vremena tretmana. Iz tablice 1. vidljivo je da je najveći pad pH zabilježen u vodi, u kojoj je upuhan zrak prilikom plazma tretmana, gdje je pH vrijednost uzorka prije tretmana iznosila 6,24 te je pala na 2,8 nakon tretmana. Isti pad pH vrijednosti u svom eksperimentu zamijetili su (Ma i sur., 2015). Destiliranu vodu podvrgavali su desetominutnom tretmanu atmosferskom plazmom u kojem se pH vrijednost sa 7 smanjila na 3,2 pH jedinice. Najviša pH vrijednost zabilježena je u uzorku u kojem se prilikom plazma tretmana upuhivao kisik pri frekvenciji od 90 Hz i iznosi 6,89 pH jedinica. Sniženje pH vrijednosti je posljedica stvaranja spojeva kao što su reaktivni oblici kisika i dušika koji nastaju izlaganjem plina električnim pražnjenjima (L. Sivachandiran, A. Khacef, 2017) .

Temperatura

U ovom eksperimentu temperatura se linearno odnosi sa duljinom tretmana i primijenjenom frekvencijom. Najviša temperatura zabilježena je u uzorku izloženom tretmanu pri 90 Hz uz zrak kao radni plin i iznosi 47,9 °C. Iz tablice 1 vidljivo je da najniža temperatura je zabilježena u uzorku u koji je upuhivan kisik i iznosi 25,1°C kod frekvencije 60 Hz. Porast temperature medija u reaktoru ovisit će o odnosu dovedene snage i protoka plina, odnosno energetske gustoći, smjesi plinova, vremenu zadržavanja i tipu reaktora (Parvulescu i sur., 2012).

Električna vodljivost

Iz dobivenih rezultata u tablici 1 vidljivo je da se električna vodljivost linearno odnosi sa porastom frekvencije i duljine primijenjenog tretmana. Raspon izmjerenih vrijednosti je od 2,18 do 398 μScm^{-1} . Za vodu tretiranu sa dušikom i zrakom dobivene vrijednosti za električnu vodljivost obrnuto su proporcionalne s primijenjenim frekvencijama. To možemo povezati sa većom promjenom temperature tih uzoraka. Prilikom određivanja vodljivosti odnosno koncentracije iona, temperatura uzorka mora biti konstantna kako bi se provela točnija mjerenja. Najvišu vodljivost pokazuje voda tretirana zrakom pri 90Hz i iznosi 398 μScm^{-1} . (Xu i sur., 2016) slične su rezultate dobili u svom radu u kojem su zabilježili porast električne vodljivosti sa 17 na 218 $\mu\text{S/cm}$ u PAWu u kojoj je radni plin zrak . Smatraju kako vrijednost vodljivosti ovisi o primijenjenom naponu prilikom plazma tretmana. Porastu

električne vodljivosti doprinose ioni i reaktivni oblici nastali prilikom plazma tretmana (Rohit Thirumdas i sur., 2018).

Zasićenost kisikom

Udio kisika je porastao u svim uzorcima i očekivano najveći udio je izmjeren u uzorku tretiranom sa kisikom i veći je od 300 %sat, nešto manji udio je zapažen u uzorku tretiranom sa zrakom (80,7 %sat). Najniža zasićenost kisikom je izmjerena u uzorku tretiranom sa argonom pri 60 Hz i iznosi 32,5 %sat.

Proizvodnja vodikova peroksida (H_2O_2)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su najviše koncentracije vodikova peroksida izmjerene kod tretmana pri 90 Hz, dok pri tretmanu od 120 Hz koncentracija značajno se smanji. To vrijedi za sve plinove. Iz tablice 1 uočljivo je da je najviša koncentracija peroksida izmjerena u vodi tretiranoj sa argonom i iznosi 25,61 mg/L, a najniža koncentracija vodikova peroksida određena je u vodi tretiranoj sa dušikom. Kod tretmana PAW vode pri 90 i 120 Hz uz upuhivanje dušika nije detektiran nastanak vodikova peroksida. Peroksidi zajedno sa ostalim reaktivnim oblicima kisika potiču klijavost sjemenki tako da prekinu stanje mirovanja odnosno dormancije (Rohit Thirumdas i sur., 2018). (N. Puač, M. Gherardi, M. Shiratani, 2018) smatraju da prisustvo vodikovog peroksida u PAW- u može aktivirati CAT gene odgovorne za sintezu novih proteina koji potiču klijavost sjemenki rajčice *Paulownia*. U eksperimentu u kojem je sjeme tretirano sa vodom u kojoj je koncentracija vodikovog peroksida iznosila 100 mM, nakon deset dana inkubacije zabilježen je porast izdanka i korijena za 79% (Su L, 2016). Ako usporedimo rezultate dobivene za koncentracije peroksida i postotke klijavosti, možemo uočiti da koncentracija peroksida u našem slučaju nije u korelaciji s klijavosti. Uzorci u kojima su izmjerene najviše koncentracije ujedno uzrokuju najmanji postotak klijavosti (PAW Ar), a oni uzorci u kojima su izmjerene najniže koncentracije peroksida uzrokuju najveći postotak klijavosti (PAW N_2). U vodi tretiranoj sa kisikom zabilježena je druga najviša koncentracija peroksida u ovom eksperimentu i tretmanom sjemenke tom vodom pokazan je najpovoljniji utjecaj na dužinu korijena i izdanka.

4.3.2. Utjecaj plazma aktivirane vode na klijavost ječma

Promatran je učinak plazma aktivirane vode na duljinu korijena i klice tijekom šestodnevno tretmana. Zapaženi su pozitivni učinci na svim uzorcima sjemeni osim onih koji su tretirani

plazma aktiviranom vodom u kojoj je radni plin argon. Najbolji utjecaj na klijavost ječma pokazale su se PAW tretirane kisikom i dušikom. Najveća vrijednost za dužinu korijena zabilježena je kod tretmana sa kisikom pri 60 Hz i iznosi 11,43 cm. Voda tretirana sa dušikom pri 120 Hz pokazala je najpozitivniji učinak na duljinu klice koja iznosi 6,73 cm. Razlog tome je da se generiranjem plazme u dušiku razvijaju nitrati i nitriti koji su jedni od najpotrebnijih spojeva rast biljke. U ovom eksperimentu kao najslabije učinkovit plin pokazao se argon. Vrijednosti dobivene njegovim tretmanom znatno su manje u odnosu na rezultate dobivene slijepom probom i ostalim plinovima. Sarinont i sur. (2017.) slične rezultate dobili su u svom eksperimentu u kojem voda s upuhanim argonom nije pokazivala napredak u duljini korijena i izdanka sjemenke rotkvice. Kao najbolja frekvencija kod tog tretmana pokazala se 90 Hz gdje je duljina korijena 4,3 cm, a klice 3,6 cm. Treba spomenuti da primjenom plazma aktivirane vode kod većine tretmana proklijale su sve sjemenke ječma (100%), izuzetak je tretman sa argonom u kojem je postotak klijavosti 72%. Dobiveni rezultati induciraju da reaktivni kemijski spojevi nastali tijekom plazma tretmana su ključni spojevi koji imaju utjecaj na rast biljke. Njihovom disocijacijom i međusobnim interakcijama sa molekulama vode nastaju produkti koji potiču klijavost sjemenke (Thapanut Sarinont i sur., 2017).

4.3.3. Utjecaj plazma aktivirane vode na koncentraciju klorofila u klici proklijalog ječma

Iz tablice 2 možemo vidjeti izmjerene koncentracije ukupnih klorofila u klicama proklijalog ječma. Uočljivo je da je najviša koncentracija izmjerena u klicama koje su bile tretirane vodom u koju je upuhan zrak pri 60 Hz i iznosi 18,98 mg/100g. Dobiveni rezultati su 5,5 puta veći u odnosu na kontrolni uzorak u kojem koncentracija ukupnih klorofila iznosi 3,45 mg/100g. Najniža koncentracija je izmjerena u klici tretiranoj vodom s argonom i iznosi 1,56 mg/100g. U uzorcima tretiranim sa vodom u kojoj su upuhani kisik i zrak, koncentracija ukupnih klorofila u klici smanjuje se s porastom frekvencije i duljine tretmana vode. U slučaju uzoraka tretiranih s vodom u kojoj su upuhani argon i dušik, koncentracija ukupnih klorofila smanjuje se porastom frekvencije do 90 Hz te kod 120 Hz zabilježena je najviša koncentracija. U eksperimentu kineskih znanstvenika, u kojem je voda tretirana plazma tretmanom pri 80 Hz uz helij kao radni plin, korištena za praćenje klijavosti pšenice. Rezultati su pokazali kako nakon tretmana koncentracija ukupnih klorofila je porasla za 15,7% u odnosu na kontrolni uzorak (JIANG i sur. , 2014). Na udio klorofila i karotenoida utječe udio

mineralnih soli prisutnih u hranjivu (uzgoju). (Bojović, 2005) u svom radu govori o sjemenu (klici) pšenice koja je uzgojena u zemlji koja je prethodno podvrgnuta umjetnim poboljšivačima te odraz na količinski sastav klorofila i karotenoida, kako gnojidbom mineralnog segmenta možemo utjecati na pigmentski sastav. Autor ističe dobivene maksimalne vrijednosti ukupnog klorofila od 2,4 do 3,2 mg/100g uz korišteno dušično gnojivo prilikom uzgoja. U našem tretmanu primjenom hladne plazme kod uzorka ječma uz dušik kao radni plin dobili smo 1,99 puta veću koncentraciju ukupnih klorofila (6,88 mg/100g). Udio klorofila možemo povezati sa rastom biljke; što je veći stadij rasta to biljka sadrži više klorofila (Sato, 2018) . To možemo primijeniti na našem istraživanju u kojem su sjemenke ječma, tretirane sa vodom u kojoj je radni plin dušik, imale najoptimalniji omjer postotka klijavosti (98%) i koncentracije ukupnih klorofila.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Izlaganje vode plazma tretmanu uzrokuje promjenu njezinih fizikalno kemijskih karakteristika, najviše pH vrijednosti i koncentracije vodikovog peroksida. Zabilježen je pad u pH vrijednosti što za posljedicu ima stvaranje kisele sredine, a samim time i nepovoljne uvjete za rast mikroorganizama. Drugi najveći porast koncentracije vodikovog peroksida zabilježen je u vodi u kojoj je prilikom plazma tretmana upuhan kisik. Takva voda je imala najpovoljniji utjecaj na dužinu korijena i klice sjemenki ječma.
- Plazma aktivirana voda pozitivno utječe na klijavost sjemena. Rezultati pokazuju da je duljina klica tretirani PAWom za 1,09 puta veća u odnosu na duljinu klice tretirane običnom vodom. Razlog tome je povećana koncentracija reaktivnih oblika kisika i dušika koji doprinose razvoju dušikovih spojeva koji su neophodni biljci za rast i razvoj.
- Ovim je eksperimentom dokazano da primjenom PAWa povećava se udio ukupnih klorofila i to za 5,5 puta kada je sjeme tretirano PAWom u kojem je radni plin zrak.

6. LITERATURA

- Badawi. (7. ožuljak 2018). *Klice zelenog ječma*. Preuzeto 27. kolovoz 2018 iz Poliklinika Badawi: <http://poliklinika.badawi-su.com/klice-zelenog-jecma/>
- Bogaerts, A. (2002). Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochimica Acta Part B*. 57, 609-658.
- Bojović, S. (2005). *CHLOROPHYLL AND CAROTENOID CONTENT IN WHEAT CULTIVARS AS A FUNCTION OF MINERAL NUTRITION*. Kraguljevac: Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, 34000 Kragujevac.
- Fridman, G. (2008). Applied Plasma Medicine. *Plasma processes and polymers*, 23-35.
- Gagro, M. (1997). Ratarstvo obiteljskog gospodarstva. U M. Gagro, *Žitarice i zrnate mahunarke* (str. 97-102). Zagreb: Hrvatsko agronomsko društvo.
- JIANG i sur. . (2014). Effect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat. *Plasma Science and Technology*, 54.58.
- L. Sivachandiran, A. Khacef. (2017). Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *RSC Advances*, 1822–1832.
- Lakshman K. Randeniya, G. J. (2015). Non-Thermal Plasma Treatment of Agricultural Seeds for Stimulation of Germination, Removal of Surface Contamination and Other Benefits: A Review. *Plasma process and Polymers*, 608–623.
- Langmuir, I. (1928). *Oscillations in ionized gases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.
- Ma i sur. (2015). Non-thermal plasma activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. *Journal of hazardous materials* , 643-651.
- N. Puač, M. Gherardi, M. Shiratani. (2018). Plasma agriculture: A rapidly emerging field. *Plasma Processes and Polymers*, 15.
- Parvulescu i sur. (2012). *Plasma chemistry and catalysis in gases and liquids*. John Wiley & Sons.

- Rohit Thirumdas i sur. (2. svibanj 2018). Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology*, str. 6-28.
- Sato, K. (2018). On the Chlorophyll Content of Barley Plant. *Japanese Journal of Crop Science*, 3-24.
- Seefeldt, S. (2012). *Procedures for the Wet PaperTowel Germination Test*. Fairbanks: University of Alaska Fairbanks.
- Su L, L. Q. (2016). Reactive oxygen species induced by cold stratification promote germination of *Hedysarum scoparium* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 406-415.
- Takahata i sur. (2014). Improvement of growth rate of plants by bubble discharge in water. *Japanese Journal of Applied Physics*, 54.
- Thapanut Sarinont i sur. (2017). *Plant Growth Enhancement of Seeds Immersed in Plasma Activated Water*. Fukuoka: Kyushu University.
- Vršnak, B. (1996). *Temelji fizike plazme*. Zagreb: Školska knjiga.
- Xu i sur. (2016). Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms *Agaricus bisporus*. *Food chemistry*, 436-444.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marko Japic

ime i prezime studenta